

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記アミノ酸配列：

QQCG-x-QA-y-GRLCGNGLCSSQMGYCGSTAAYCGAGCSQCK-z

(式中、xはS又はRを示し、yはR又はSを示し、及びzはS又はない)を有する抗菌性ペプチドをコードするcDNA。

【請求項2】 アサガオ(*Pharbitis nil* L.)由来の配列番号8のアミノ酸配列を有する抗菌性ペプチドPn-AMP1の前駆体タンパク質をコードする配列番号5で表されるcDNA。

【請求項3】 アサガオ由来の配列番号9のアミノ酸配列を有する抗菌性ペプチドPn-AMP2の前駆体タンパク質をコードする配列番号7で表されるcDNA。

【請求項4】 請求項2のPn-AMP1 cDNAを含む植物体発現ベクター。

【請求項5】 請求項3のPn-AMP2 cDNAを含み、図2の遺伝子地図で表される植物体発現ベクターpLES9806。

【請求項6】 請求項5の植物体発現ベクターpLES9806で形質転換されたアグロバクテリウム・ツメファシエンス(*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404/pLES9806(KCTC 0548BP)。

【請求項7】 Pn-AMP1をコードする遺伝子により形質転換され、前記Pn-AMP1を発現するトランスジェニック植物体又はその後代(progeny)。

【請求項8】 トランスジェニック植物体がタバコ又は双子葉植物であることを特徴とする、請求項7に記載のトランスジェニック植物体又はその後代。

【請求項9】 Pn-AMP2をコードする遺伝子により形質転換され、前記Pn-AMP2を発現するトランスジェニック植物体又はその後代。

【請求項10】 トランスジェニック植物体がタバコ又は双子葉植物であることを特徴とする、請求項9に記載のトランスジェニック植物体又はその後代。

【請求項11】 Pn-AMP2を発現する組み換えタバコの細胞株ニコチアナ・タバカム(*Nicotiana tabacum*) cv. Xanthi-nc/pLES9806(KCTC 0549BP)。

【請求項12】 Pn-AMPをコードする遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した組み換え微生物を媒介体にし、植物細胞を形質転換し、前記植物細胞がPn-AMPを発現する段階；及び前記植物細胞を植物体の生長が誘導される条件下で培養する段階を含む抗菌耐性を有するトランスジェニック植物体の製造方法。

【請求項13】 組み換え微生物がアグロバクテリウム・ツメファシエンス LBA4404(KCTC 0548BP)であることを特徴とする、請求項12に記載のトランスジェニック植物体の製造方法。

【請求項14】 植物体がタバコ又は双子葉植物であることを特徴とする、請求項12に記載のトランスジェニック植物体の製造方法。

【請求項15】 培養は25°Cの培養器で昼長さ(day-length

gth)16時間である条件でパーミキュライト、バーライト及びビートモスが同比率で混合された苗床で行うことを特徴とする、請求項12に記載のトランスジェニック植物体の製造方法。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明はアサガオ(*Pharbitis nil* L.)種子由来の抗菌及び抗真菌性ペプチドを発現するトランスジェニック植物体に関する。より具体的には、本発明はアサガオ種子由来の抗菌性ペプチドをコードするcDNA、前記ペプチドの組み換え植物体発現ベクター、及び病原性微生物に対する耐性を有するトランスジェニック植物体に関する。

【0002】

【従来の技術】植物は病原菌の侵入から避けることができる運動性を有していないので、直接又は間接的な対応によりそれ自身を保護しなければならないのである。このような観点から、農業において病源性真菌(fungal pathogen)の防除は重要な課題となり、農作物を栽培する際に、真菌が起因になって発生する病を防ぐための努力が続いてきた。主に、真菌防除のための従来の研究は、衛生学的又は化学的分野に集まっており、効果的殺真菌剤(fungicide)の開発につれ、ある程度、真菌感染による損害が低減してきた。しかしながら、ボトリティス・シネリア(*Botrytis cinerea*)、フサリウム・オキシスポラム(*Fusarium oxysporum*)、フィトフトラ・パラシティカ(*Phytophthora parasitica*)、アルテナリア・アルテリザタ(*Alternaria alternata*)等のような多様の真菌類に対しては、それに抵抗性を有する農作物を開発するための育種研究や遺伝子工学研究で多大な成果を納め得なかった。

【0003】最近、当該分野において病因関連(P R)タンパク質(pathogenesis-related protein)やフィトアレキシン(phytoalexin)等のような相異なる分子量群に属する抗菌剤からなる植物体の動的防御体系(dynamic defense system)の研究が行われてきている。植物は、病原菌から自分自身を保護するための高等動物に見られる免疫系を有しておらず、主としてシステイン及びグリシンに富む種々の小さい抗菌性タンパク質等の抗菌剤によって、病原菌の侵入から自分自身を保護している。

【0004】このような抗菌性タンパク質の中で、ヘベイン(hevein)領域を有したキチン結合タンパク質は相互類似な配列を共有し、多様な抗菌活性、特に抗真菌活性を表すと知られている。例えば、キチン結合タンパク質の中に、キチナーゼ(参照：Schumbaum, A.ら, *Nature*, 324:365-367, 1986)、小麦胚芽の凝集素(wheat germ agglutinin, WGA, 参照：Andersen, N. H.ら, *Biochem.*, 32:1407-1422, 1993)、バーウィン(barwin, 参照：Hejgaard, J.ら, *FEBS Lett.*, 307:389-392, 1992)、植物デ

フェンシン(plantdefensin, 参照: Terras, F. R. G. ら, Plant Cell, 7:573-588, 1995)、レクチン(参照: Peumans, W. J. ら, Plant Physiol., 109:347-352, 1995)、ミラピリス・ジャラバ(Mirabilis jalapa)とアマランサス・コダタス(Amaranthus caudatus)由来の抗菌ペプチド(参照: Broekaert, W. F. ら, Biochemistry, 31:4308-4314, 1992; Cammue, B. P. A. ら, J. Biol. Chem., 267:2228-2233, 1992)等が挙げられる。

【0005】キチン結合タンパク質が分子レベルでどうい  
いう機構を通じて抗真菌活性及び／又は抗細菌活性を表  
わすかは今まで明らかになっていない。Van Parijsらは  
ヘベイン及びユリテカ・デオイカ凝集素(Uritica dio  
ica agglutinin, UDA)の抗真菌活性は、そのタンパク質  
分子の大きさと関連があると報告している(参照: VanPa  
rijs ら, Planta, 183:258-264, 1991)。すなわち、それ  
らのタンパク質の大きさがかなり小さいため、真菌の細  
胞壁を通過して原形質膜に至ることができ、そこで真菌  
細胞壁の形態形成に影響を及ぼすと予測した。さらに、  
強塩基性で、システインに富む小さい抗菌性タンパク質  
であるチオニン(thionin)の場合は、原形質膜に穴を作  
って、膜を破壊し、その結果、微生物体が死んでしま  
うと推測されている(参照: Florak, D. E. A. 及び Stiekem  
a, W. J., Plant Mol. Biol., 26:25-37, 1994)。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】抗真菌性タンパク質を  
コードする遺伝子を農作物に導入することにより、真菌  
性病原体の感染を部分的に抑えることができるが、トラ  
ンスジェニック植物体の防御機構が種-特異的な病原体  
認識に基づくものであること、トランスジェニック植物  
体の発現タンパク質が熱変性のために十分な生物活性を  
表さないこと、植物体から発生する予想できない副作用  
の恐れもあること等から、満足すべきものでないことが  
判明した。したがって、種々の細菌及び真菌に対して広  
範囲の抗菌活性を表すと共に、安定で副作用のない、植  
物体の抗菌性を効果的に増加させることができる技術の  
開発が求められてきた。

【0007】

【課題を解決するための手段】この故、本発明者らは植  
物体に効果的な抗菌活性を与えることができ、熱に安定  
で、副作用のない抗菌ペプチドを分離するために鋭意研  
究努力した結果、成熟したアサガオ(Pharbitis nil L.)  
の種子より強力な抗菌活性を有するPn-AMP1及びPn-AMP2  
ペプチドを分離精製し、アサガオ種子のcDNAライブラリ  
ーにより前記ペプチドらをコードするcDNAを各々分離し  
て、それを植物体の発現ベクター中にクローニングを行  
った。次に、アグロバクテリウムを媒介にし、前記抗菌  
性ペプチドを発現する植物体を製造し、前記植物体が広  
範囲の抗病因菌活性を示すことを見出し、本発明を完成  
するに至った。

【0008】従って、本発明の一番目の目的は、成熟ア

サガオ種子由来の新規な抗菌性ペプチドをコードするcD  
NAを提供することにある。本発明の二番目の目的は、前  
記cDNAを含む植物体の発現ベクターを提供することにあ  
る。本発明の三番目の目的は、前記発現ベクターで形質  
転換されて、トランスジェニック植物体を製造するため  
に使用可能な組み換え微生物を提供することにある。本  
発明の四番目の目的は、前記抗菌性ペプチドを発現する  
トランスジェニック植物体を提供することにある。本発  
明の五番目の目的は、抗病因菌耐性を有するトランスジ  
ェニック植物体の製造方法を提供することにある。

【0009】

【発明の実施の形態】以下、本発明をより具体的に説明  
する。本発明のアサガオ成熟種子由来の抗菌性ペプチド  
(以下Pn-AMPという)は成熟したアサガオ種子より分離  
精製されて下記アミノ酸配列:

QQCG-x-QA-y-GRLCGNGLCCSQWGYCCSTAAYCAGCQSQCK-z

(式中、xはS又はRを示し、yはR又はSを示し、及びzはS  
又はないことを示す)を有し、Pn-AMP1及びPn-AMP2が含  
まれる。上記で、「Pn-AMP1」(アミノ酸配列を配列番  
号1に示す)は、41個のアミノ酸からなり、第5位、  
第8位及び第41位のアミノ酸として各々セリン、アル  
ギニン及びセリンを有するペプチドを意味し、又、「Pn  
-AMP2」(アミノ酸配列を配列番号2に示す)は、40  
個のアミノ酸からなり、第5位及び第8位のアミノ酸と  
して各々アルギニン及びセリンを有するペプチドを意味  
する。

【0010】Pn-AMPはキチン結合能を有する分子量約4  
k Daの塩基性ペプチドである。本発明のPn-AMPのアミノ  
酸配列を分析した結果、Pn-AMPは他のキチン-結合タン  
パク質の配列に相同性を有するシステインとグリシンに  
富むキチン結合ドメインを含んでいる新規のタンパク質  
であることが確認された。特に、Pn-AMP1及びPn-AMP2の  
アミノ酸配列はゴムラテックスであるヘベインと66%の  
配列相同性を示し、配列の違いはキチン-結合ドメイン  
内の可変領域に多く位置していた。Pn-AMPと他のキチン  
-結合タンパク質において、システイン残基はよく保存  
されていた。Pn-AMPは、真菌細胞壁がキチンを包含する  
か否かに関わらず、広範な真菌種に対して優れた抗菌活  
性を示しており、一部の細菌に対しても抗菌活性を示す  
が、昆虫細胞または哺乳動物細胞に対しては細胞毒性を  
表さなかった。

【0011】前記Pn-AMPをコードするcDNAを単離するた  
めに、成熟したアサガオ種子のcDNAライブラリーをスク  
リーニングしたところ、それぞれ約609bp、605bpのPn-A  
MP1及びPn-AMP2 cDNA(配列番号4及び6)が選択され  
た。Pn-AMP1 cDNAクローンは、5'UTR(ヌクレオチド1~4  
6)、Pn-AMP1 cDNA(ヌクレオチド47~325、配列番号  
5)、及び3'UTR(ヌクレオチド326~609)からなり、  
前記Pn-AMP1 cDNAはアミノ末端シグナルペプチド領域  
(ヌクレオチド47~121)、Pn-AMP1(ヌクレオチド122~2

44) 及びカルボキシ末端領域(ヌクレオチド245~325)からなっていることが確認された。一方、Pn-AMP2 cDNAクローンは、5' UTR(ヌクレオチド1~21)、Pn-AMP2 cDNA(ヌクレオチド22~297、配列番号7)、及び3' UTR(ヌクレオチド298~605)からなり、前記Pn-AMP2 cDNAはアミノ末端シグナルペプチド領域(ヌクレオチド22~96)、Pn-AMP2(ヌクレオチド97~216)及びカルボキシ末端領域(ヌクレオチド217~297)からなっていることが確認された。このような結果から、本発明のPn-AMP1及びPn-AMP2はまず各々92個のアミノ酸(配列番号8)及び91個のアミノ酸(配列番号9)からなる前駆体の形態で発現し、転写後修飾を経て、抗菌活性を表す成熟したペプチドに転換されることを示唆する。

【0012】また、本発明は真菌抵抗性の転移体植物を製造するに使用できるPn-AMP cDNAを含む植物体発現ベクター及びこれによって形質転換されたトランスジェニック植物体を提供する。本発明の好ましい実施態様によると、Pn-AMP2のヌクレオチド1から340までに当たる配列を含むcDNA断片をバイナリーベクターであるpGA643にクローニングし、発現ベクターであるpLES9806を製造したところ、Pn-AMP2はCaMV 35Sプロモーターの調節下で発現した。次に、前記組み換え発現ベクターのpLES9806でアグロバクテリウム・ツメファシエンシス(Agrobacterium tumefaciens) LBA4404を形質転換させ、トランスジェニック植物体の製造時、媒介体として使用できる形質転換体を得た後、この形質転換体を「アグロバクテリウム・ツメファシエンシス LBA4404/pLES9806」と命名して、それを国際寄託機関である韓国科学技術研究所(KIST)付設の生命工学研究所(KRIBB)遺伝子銀行(KCTC、大韓民国大田広域市儒成区魚恩洞52所在)に寄託番号「KCTC 0548BP」として1998年11月18日付けで寄託した。該微生物を媒介として使用してトランスジェニック植物体を作成した。

【0013】また、本発明のPn-AMPペプチドを発現する抗真菌耐性を有するトランスジェニック植物体の例として、前記アグロバクテリウム・ツメファシエンシス LBA4404/pLES9806(KCTC 0548BP)を媒介体として用い、リーフディスク形質転換法でタバコ葉の細胞にPn-AMP2 cDNAを導入し、培養することによりPn-AMP2を発現するトランスジェニックタバコを製造した。前記形質転換されたタバコの細胞を「ニコチアナ・タバカム(Nicotiana tabacum)cv. Xanthi-nc/pLES9806」と命名して、国際寄託機関である韓国科学技術研究所(KIST)付設の生命工学研究所(KRIBB)遺伝子銀行(KCTC、大韓民国大田広域市儒成区魚恩洞52所在)に寄託番号「KCTC0549BP」として1998年11月18日付けで寄託した。

【0014】トランスジェニック植物体の真菌感染に対する抵抗性の程度で導入されたPn-AMP発現の効果を測定するために、前記トランスジェニックタバコをフィトフトラ・バラシチカpv.ニコチアナで感染して培養した結

果、感染7日後、野生型のタバコでは疾患症状が見られ始めたが、トランスジェニックタバコの場合には感染による疾患症状を全然示さず、健康であった。野生型植物体の葉では真菌の菌糸体が広がっていたが、トランスジェニック植物体の葉ではそのような菌糸体の成長は観察されなかった。本発明により、Pn-AMPをコードする遺伝子を目的とする植物体に導入することにより、真菌感染に対する抵抗性を高めることができる。従って、本発明の組み換え発現ベクター及びこれによって形質転換された微生物を、農作物の真菌による病気の抑制に使用することができることが示唆される。

【0015】

【実施例】以下、実施例によって本発明をより具体的に説明するが、これらの実施例は専ら本発明をより具体的に説明するためのものであって、本発明の範囲がこれらの実施例により限らないことは当業者には理解されよう。

【0016】実施例1：成熟アサガオ種子からの抗菌性ペプチドの単離

20 実施例1-1：抗菌性ペプチドの単離及び精製

アサガオ(Pharbitis nil L.)の乾燥した成熟種子50gを微細な粉末になるように粉碎し、10mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、15mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、100mM KCl、1mM EDTA、及び1mM チオ尿素を含む抽出用緩衝液(pH6.0)500mlの中に懸濁した。前記懸濁液を4°Cで3時間攪拌した後、30分間32,000xgで遠心分離して、上清液を回収した。この上清液に固形硫酸アンモニウムを30%相対飽和(relative saturation)濃度となるように加えた。次に、32,000xgの条件で30分間遠心分離し、沈澱物を除去した後、上清液を再び硫酸アンモニウムで70%相対飽和に調整し、それを32,000xgの条件で30分間再遠心分離して沈澱物を得た。前記沈澱物を180mlの脱イオン水に再溶解し、含まれている分子量の大きいタンパク質を変性させるために80°Cで15分間熱処理した。熱によって変性したタンパク質は32,000xgの条件で30分間遠心分離して除去した。得られた上清液は脱イオン水で十分透析した後、溶液を25mM NaClを含む10mMリン酸緩衝液(pH6.0)に加え、同じ緩衝液で平衡化したCM5 2-セルロースカチオン交換カラムに注入し、数回洗浄した後、520mM NaClを含む10mMリン酸緩衝液(pH6.0)でカラムに吸着したタンパク質を溶出し、各画分の抗菌活性を調べた。CM-セルロースカラムの活性を示す画分を合わせ、10mMリン酸緩衝液(pH6.0)で平衡化したODS-A12 0逆相C<sub>18</sub>オープンカラム(open column, 0.5cmx25cm, YMC-ゲル, Japan)に注入し、水で数回洗浄した後、0%から80%までのアセトニトリルの直線濃度勾配の条件で溶出させた。各画分の抗菌活性を調べて、活性画分を合わせ、真空濃縮器で乾燥した。乾燥した試料を0.05%トリフルオロ酢酸に溶解した後、ギルソン(Gilson)HPLCシステムに連結したODS-120Tカラム(0.5cmx25cm, Tosyo, Japan)の逆相HPLCにかけた。0~60%の直線勾配の溶

液B(0.05%(v/v)TFA/アセトニトリル)を含む溶液A(0.05% TFA/水)を使用して、1ml/分の流速条件でタンパク質を60分以内で溶出させた。その結果、溶出曲線上で2つのピークがほとんど同時点に表れ、対応する2個の画分をそれぞれ集めて、前記と同様な条件で再び逆相HPLCを行い、更に精製した。その結果、2つのピークが正確に区分され、各ピークに含まれる単一のポリペプチドは分子量が約4 kDaで、多様な真菌に対して優れた抗菌活性を示したため、各々のペプチドをそれぞれ「Pn-AMP1」及び「Pn-AMP2」と命名した。

【0017】実施例1-2: アミノ酸配列分析及びキチン結合ドメインの特性付け

前記実施例1-1で精製したPn-AMP1とPn-AMP2のアミノ酸配列を決定するために、各々のペプチドを還元させ、S-カルボキシメチル化してトリプシンで分解し、配列決定に適したペプチド断片を得た(参照: Creighton, J. E. In Protein Structure, a practical approach, Creighton, T.E. 編, pp155-167, IRL Press, Oxford, 1989)。精製した抗菌ペプチド(100-500pmol)を、8 M尿素を含む0.4 M NH<sub>4</sub> HCO<sub>3</sub> 50mlに溶解し、5 mlの4.5 mM DTTを直ちに添加し、50℃で15分間インキュベートした。冷却後、5 mlの100 mM ヌウ化アセトアミド溶液を添加し、反応混合液を室温で15分間インキュベートした。次に、混合液を水で3倍に希釈し、逆相HPLCカラム(Chemosorb 5-ODS-H, 2.1mm×100mm)上に直接注入した。ペプチド断片は0-60% (v/v) 直線勾配のアセトニトリルを使用し、流速0.2分/mlで分離した。精製した各々のペプチド断片をABI 473A Protein Sequencer(Applied Biosystems Inc., U.S.A.)を用いてアミノ酸配列を分析した。その結果、成熟Pn-AMP1及びPn-AMP2は各々41個及び40個のアミノ酸からなり、第5位、第8位及び第41位のアミノ酸を除く残りの部分では二つのペプチドが同一アミノ酸配列を共有していることが確認された。すなわち、Pn-AMP1(配列番号1)は、第5位のアミノ酸がセリン、第8位のアミノ酸がアルギニンであり、第41位のアミノ酸としてセリンを有する41個のアミノ酸からなるペプチドであり、Pn-AMP2(配列番号2)は、第5位のアミノ酸がアルギニン、第8位のアミノ酸がセリンである、40個のアミノ酸からなるペプチドである(図1)。したがって、前記Pn-AMP1とPn-AMP2はいわゆる異性体(isomer)の関係であると推測され、Pn-AMP1とPn-AMP2を総称して「Pn-AMP」と称することにした。

【0018】一方、従来のキチン結合タンパク質と本発明のPn-AMPとの配列相同性を分析した結果、Pn-AMP1及びPn-AMP2はキチン結合タンパク質のアミノ酸と相同性を有するシステインとグリシンに富むキチン結合ドメインを含む新規のタンパク質であることが確認された(図1)。図1で、陰影をつけたボックス内の配列はタンパク質間の同一アミノ酸の部分を示し、点は最適な整列のために導入した空白を示す。また、ヘベインはゴム

ラテックス(rubber latex)ヘベイン、CBP20はタバコの抗真菌タンパク質、大麦CHIは大麦のキチナーゼ、米CHIは米のクラス1キチナーゼ、UDAはユリチカ・デオイカ凝集素(Uritica dioica agglutinin)、WGA3は小麦の胚芽凝集素3であるイソレクチン、及びAc-AMP2はアマランサス・コダタス(Amaranthus caudatus)由来の抗真菌ペプチドを各々示す。右側の数は各々のタンパク質中のアミノ酸番号を示す。図1に示すように、Pn-AMP1及びPn-AMP2のアミノ酸の配列はラバーラテックスヘベインと一番類似で、66%の配列相同性を示し、特にシステイン残基はPn-AMP1及びPn-AMP2から他のキチン結合タンパク質でよく保存されている。配列の違いはキチン結合ドメイン内の可変領域にしばしば見られる。しかしながら、このような高い配列相同性に関わらず、成熟Pn-AMP1及びPn-AMP2(pI=8.6)はヘベイン(pI=4.6)に比べて強塩基性を示し、この高pI値はPn-AMP内の4個のアルギニン残基の存在のためである。一方、Pn-AMP1とPn-AMP2におけるキチン結合能をキチンカラムを用いて測定した結果、両ペプチドがキチンに対して強い親和性を有していることが確認された。

【0019】実施例1-3: Pn-AMPの抗菌活性測定

本発明で分離精製した抗菌性ペプチドの抗菌活性は、Broekaertらの方法によって、顕微分光光度法(microspectrophotometry)で測定した(参照: Broekaert, W. F.ら, Biochemistry, 31:4308-4314, 1992)。試験菌は、細胞壁にキチンのない真菌類を含んだ全8種の植物感染性の真菌である、即ち、ボトリティス・シネリア(Botrytis cinerea)、コレトリカム・ランジナリウム(Colletotrichum lanigenarium)、リゾクトニア・ソラニ(Rhizoctonia solani)、フサリウム・オキシスポラム(Fusarium oxysporum)、フィトトラ・バラシチカ(Phytophthora parasitica)、フィトトラ・カプシシ(Phytophthora capsici)、ピチウム・spp.(Pythium spp.)、及びスクレロチニア・スクレロチオラム(Sclerotinia sclerotiorum)とともに、酵母であるサッカロマイセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)を用いた。全真菌をポテト・デキストロース寒天培地またはV8寒天培地を用いて25℃で培養し、カビ孢子または菌糸をDuvickらの方法(参照: Duvick, J.P.ら, J. Biol. Chem., 267:18814-18820, 1992)やSingletonらの標準方法(参照: Singleton, L. L.ら, In Methods for Research on Soil-borne Phytopathogenic Fungi, APS Press, Minnesota, 1992)によって収集した。次に、多様な濃度の成熟Pn-AMP1及びPn-AMP2溶液20μlを、1ml当たり10<sup>4</sup>個のカビ孢子、100個のカビ菌糸片、または10<sup>4</sup>個の酵母を含む増殖培地(半強度(half-strength)ポテト・デキストロースブロス)80μlと96ウェルのマイクロプレートの各ウェル中で混合した。ここで、対照群にはペプチド溶液の代わりに殺菌した蒸留水を加えた。25℃で48時間培養した後、595nmでの吸光度を測定することにより成長阻害率を求めて、用

量-応答曲線(ペプチドの濃度に対する成長阻害率の曲線)から50%成長阻害に必要なペプチドの濃度(IC<sub>50</sub>)を算出した。その結果、Pn-AMP1及びPn-AMP2は広範囲の植物感染性のカビと酵母に対して強力な抗菌活性を表し、真菌に対するIC<sub>50</sub>は0.6-75 µg/mlであって、この値はアマランツ(amaranth)キチン-結合タンパク質であるAc-AMPのIC<sub>50</sub>と同様であった(参照: Broekaert, W. F.ら, Biochemistry, 31:4308-4314, 1992)。更に、Pn-AMP1及びPn-AMP2はキチンを含んでいる真菌のみでなく、細胞壁にキチンを含んでいない真菌類である卵菌類(Oomycetes)まで広範囲の阻害効果を有し、Pn-AMPのキチン結合能が真菌の成長阻害に必須でないことを示した。

【0020】一方、チオニン(参照: Teras, F. R. G.ら, Plant Physiol. 103:1311-1319, 1993)、Ac-AMP及び植物ディフェンシン等の、いくつかの塩基性を示す抗菌性ペプチドは陽イオン、特にCaCl<sub>2</sub>により強力に阻害されることが報告されている(参照: Osborn, R. W.ら, FEBS Lett. 368:257-262, 1995)。Pn-AMP1及びPn-AMP2に対するCaCl<sub>2</sub>の拮抗効果(antagonistic effect)を調べるために、5mMのCaCl<sub>2</sub>の存在下でペプチドのIC<sub>50</sub>を決定したところ、IC<sub>50</sub>値が47倍〜250倍程度上昇することが確認された。

【0021】Pn-AMPがグラム陰性細菌(大腸菌、アグロバクテリウム・ツメファシエンス)とグラム陽性細菌(バシルス・サブチリス(Bacillus subtilis))に対しても成長阻害効果を示すか否かを検査するために、これらをPn-AMP1及びPn-AMP2の存在下で培養した。多様な濃度の成熟Pn-AMP1及びPn-AMP2溶液20 µlを、1ml当たり10<sup>6</sup>個の細菌を含むLB培地80 µlと96ウェルマイクロプレート(各ウェル中で混合した。次にPn-AMPの抗菌活性をIC<sub>50</sub>で測定した結果、200 µg/mlまでの濃度においてもグラム陰性細菌の生存には何の影響も及ばなかった。一方、グラム陽性細菌であるバシルスサブチリスに対して、Pn-AMP1の場合には38 µg/mlのIC<sub>50</sub>値で、Pn-AMP2の場合には20 µg/mlのIC<sub>50</sub>値であった。5mMのCaCl<sub>2</sub>の存在下では、Pn-AMP1及びPn-AMP2とも、200 µg/mlの濃度で成長阻害は観察されなかった。

【0022】実施例1-4: Pn-AMPの細胞毒性分析  
本発明のPn-AMPの細胞毒性を調べるために、サル腎臓の細胞系であるMA104細胞株及び昆虫細胞系であるSf9(スポドプテラ・フランジペルダ(Spodoptera frugiperda) 9)細胞株を用いて、Broekaertの方法(Broekaert, W. F.ら, Biochemistry, 31:4308-4314, 1992参照)に従って、細胞の生存能試験を行った: 1 × 10<sup>6</sup>個のSf9細胞とMA104細胞を各々グレース培地(Grace's media, Life Technologies, Inc., U.S.A.)、DMEM培地(Dulbecco's modified Eagle medium, Life Technologies, Inc., U.S.A.)で培養した。次に、Pn-AMP1及びPn-AMP2の存在下で24時間更に培養し、トリパンブルー(trypsin blue)で染色し、細胞の生存能を顕微鏡でアッセイした。その結果、

Pn-AMP1及びPn-AMP2は、動物細胞(MA104)及び昆虫細胞(Sf9)の生存には何の影響も及ばないことが確認された。

【0023】実施例2: Pn-AMP cDNAのクローニング  
実施例2-1: アサガオ種子mRNA由来cDNAライブラリーの製造

Pn-AMPをコードするcDNAをクローニングするため、まずアサガオ種子mRNA由来のcDNAライブラリーを製造した: 開花後、40日経ったアサガオより成熟した種子2gを取って、Maniatisらの標準的な方法によって全RNA及びポリ(A)+ RNAを抽出した。次に、λ ZAPII cDNA合成キット(Stratagene, U.S.A.)を用いて、製造社の指示によって前記ポリ(A)+ RNA 5 µgから二本鎖(ds)のcDNAを合成した。ds cDNA 500ngをpBluescriptII(SK-)プラスミド(Stratagene, U.S.A. 200ng)のEcoRI/XhoI部位にライゲートし、プラスミドベースのcDNAライブラリーを製造した。前記cDNAライブラリーのプラスミドを大腸菌XL1-blue(Stratagene, U.S.A.)にエレクトロポレーション法で導入し、100 µg/mlのアンピシリンを含むLB培地で培養した結果、およそ10<sup>4</sup>個の形質転換体が形成された。

【0024】実施例2-2: Pn-AMP cDNAを含むクローンの選別

cDNAライブラリーのスクリーニングのためのDNAプローブは、前記実施例2-1で製造したds cDNAを鋳型として用い、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)より得た。その際、プライマーとしては、Pn-AMP1及びPn-AMP2に発見されるキチン結合ドメインのアミノ酸配列(CCSQMGYC)より類推して合成した、下記の塩基配列を有するCG1プライマー: 5'-TG(C/T)TG(C/T)(A/T)(C/G)NCA(A/G)TGGGGNTA(C/T)TG(C/T)GG-3' (配列番号3)

とオリゴ(dT)プライマーを用いた。

【0025】PCRは、50ngのds cDNA、100ngのCG1プライマー、20ngのオリゴ(dT)プライマー、Taqポリメラーゼ(Promega)及び10 × Taqポリメラーゼ緩衝液(Promega)を含み、最終容積は50 µlで実施した。増幅プログラムは、94°Cで2分間の初期活性化段階の後、94°Cで30秒、50°Cで30秒、72°Cで1分とする反応を40サイクル繰り返し、最後に72°Cで10分間の伸長段階とした。反応が完了した後、およそ500bpの大きさの増幅PCR産物を1%アガロースゲルで精製し、ランダムプライミングラベリングキット(Random-Priming Labeling Kit: Amersham, U.S.A.)を用いてα-<sup>32</sup>P[dCTP]で標識した。

【0026】実施例2-3: Pn-AMP1のcDNAクローンの単離

実施例2-1で得た約10<sup>4</sup>個のcDNA含有プラスミドで形質転換された大腸菌コロニーに対して実施例2-2で製造した<sup>32</sup>Pで標識されたPCR産物を用いて、インジツコロニーハイブリダイゼーションによるスクリーニングを行った。2回のスクリーニングの結果、50個の陽性コロニーが単離された。前記陽性コロニーよりプラスミドDNAを各々

抽出し、タクダイブライマーサイクルシーケンシングキット (Taq Dye Primer Cycle Sequencing Kit; Perkin-Elmer, U.S.A.)を用いて、ABI373A 自動DNAシーケンサー (Applied Biosystems Inc., U.S.A.)でds cDNAの塩基配列を分析した。全50個のクローン中35個のクローンは、5'及び3'末端部分の長さが若干違うことを除いては同一の塩基配列を示した。その中で一番長いcDNAクローンの長さは、609bp (配列番号4)であるが、DNASISプログラムで塩基配列を分析した結果、5'UTR (ヌクレオチド1~46)、Pn-AMP1 cDNA (ヌクレオチド47~325; 配列番号5)、及び3'UTR (ヌクレオチド326~609)からなり、Pn-AMP1 cDNAはアミノ酸末端のシグナルペプチド領域 (ヌクレオチド47~121)、Pn-AMP1 (ヌクレオチド122~244)、及びカルボキシ末端領域 (ヌクレオチド245~325)からなっていることが確認された。

【0027】実施例2-4: Pn-AMP2のcDNAクローンの単離  
実施例2-3で調製した50個のクローン中前記35個のクローンを除いた15個のクローンには、5'及び3'末端部分の長さが若干違うことを除いては、同一の塩基配列を示した。その中で一番長いcDNAクローンの長さは605bp (配列番号6)であるが、DNASISプログラムで塩基配列を分析した結果、5'UTR (ヌクレオチド1~21)、Pn-AMP2 cDNA (配列番号7; ヌクレオチド22~297)、及び3'UTR (ヌクレオチド298~605)からなり、Pn-AMP2 cDNAはアミノ末端のシグナルペプチド領域 (ヌクレオチド22~96)、Pn-AMP2 (ヌクレオチド97~216)、及びカルボキシ末端領域 (ヌクレオチド217~297)からなっていることが確認された。このような結果から、本発明のPn-AMP1及びPn-AMP2が各々92個のアミノ酸 (配列番号8)と91個のアミノ酸 (配列番号9)からなる前駆体の形態で発現された後、転写後修飾によって抗菌活性を示す成熟ペプチドとして得られることが示唆された。

【0028】実施例3: Pn-AMP2発現ベクターの構築及び形質転換体の製造

Pn-AMP2発現ベクターを製造するために、Pn-AMP2 cDNAを含有するpBluescriptISK(-)ベクターをXbaII/ClaIで完全に切断し、全コード領域を含むヌクレオチド1~340に当たる340bpのDNA断片を0.8%アガロースゲルで回収した。前記340bp DNA断片をバイナリーベクターであるpGA643のXbaII/ClaI部位にライゲートし、植物体発現ベクターであるpLES9806を製造した (参照: 図2)。図2で、nptIIは、ノバリン(nopaline)合成酵素のプロモーター及びターミネーター、及びネオマイシンホスホトランスフェラーゼIIのコード領域を含むカナマイシン抵抗性を表すキメラ遺伝子を表し、CaMV 35Sはカリフラワーモザイクウイルス(CaMV)の35Sプロモーターを示す。

【0029】次に、pLES9806でアグロバクテリウム・ツメファシエンシスLBA4404をエレクトロポレーションによって形質転換した後、10µg/mlのカナマイシン及び5µg/mlのテトラサイクリンを含むLB寒天プレートの選択培

地に塗抹し、28°Cで2日間培養して形質転換体を選別した。選別された形質転換体を「アグロバクテリウム・ツメファシエンシスLBA4404/pLES9806」と命名して、これを1998年11月18日に国際寄託機関である韓国科学技術研究所 (KIST) 付設の生命工学研究所 (KRIBB) 遺伝子銀行 (KCTC、大韓民国大田広域市儒成区魚恩洞52所在)に寄託番号「KCTC 05488P」として寄託した。

【0030】実施例4: トランスジェニックタバコの製造

10 アグロバクテリウムが媒介するリーフディスク形質転換法 (Agrobacterium-mediated leaf disc transformation)を用いて、Pn-AMP2を発現するトランスジェニックタバコを製造した (参照: Horsch, R.ら, 1984, Science, 233:496-498): タバコ (Nicotiana tabacum cv. Xanthi-nc)のリーフディスクに実施例3で得たアグロバクテリウム・ツメファシエンシスLBA4404/pLES9806 (KCTC 05488P)を接種して2日間培養し、次いで選択培地 (0.5mg/l牛血清アルブミン、ムラシゲスケーグ (Murashige-Skoog) 塩、3%シュクロース、100mg/l カナマイシン、250mg/l シュードベン及び0.8%アガロースを含む)に移してカルスの成長を誘導した。前記カルスを培養して一ヶ月経った後、再生した苗条をパーミキュライト、パーライト及びビートモスが同比率で混合された苗床に移し、25°Cの培養器で昼長さ (day-length) 16時間の条件で培養して成長させた。得られたタバコ細胞を「Nicotiana tabacum cv. Xanthi-nc/pLES9806」と命名して、1998年11月18日に国際寄託機関である韓国科学技術研究所 (KIST) 付設の生命工学研究所 (KRIBB) 遺伝子銀行 (KCTC、大韓民国大田広域市儒成区魚恩洞52所在)に寄託番号「KCTC 05498P」として寄託した。

30 【0031】実施例5: トランスジェニックタバコでのPn-AMP2の発現及び抗真菌耐性調査

実施例5-1: 免疫ブロット分析

実施例4で製造されたトランスジェニックタバコ (KCTC 05498P)の葉を粉砕し、抽出用緩衝液 (50mM リン酸ナトリウム緩衝液、pH6.0、0.1mM PMSF含有)に投入した。抽出物を12,000xgの条件で30分間遠心分離し、上清液を80°Cで15分間インキュベートした。遠心分離で熱変性物を除去し、濃縮過程を経て約12µgの可溶性タンパク質を得、17% SDS-PAGEで展開した。エレクトロブロッティングによってニトロセルロース膜フィルター上にタンパク質をトランスファーし、フィルターを6% (w/v) 脱脂乳含有TTBS (100mM Tris-HCl, pH7.5, 150mM NaCl, 0.1% Tween20) 中でブロックした。次いでフィルターをウサギの抗Pn-AMP2抗体、及びホースラディッシュペロキシダーゼ結合ヤギ抗ウサギ免疫グロブリンGを2次抗体として用いて免疫ブロットを行った。ECL検出溶液 (Amersham, USA)で発色反応させ、本発明のトランスジェニックタバコでPn-AMP2タンパク質が発現することを確認した。一方、ウサギの抗Pn-AMP2ポリクローナル抗体

は、フロイント完全アジュバント中のシリカマトリクスに結合した1mgの精製Pn-AMP2をウサギに皮下注射で免疫し、フロイント不完全アジュバント中の同一抗原1mgでブースティング(boosting)注射を3週間毎に行って製造した。

【0032】実施例5-2: トランスジェニックタバコの真菌感染に対する耐性

実施例5-1で本発明のトランスジェニックタバコが抗菌活性を有するPn-AMP2ペプチドを発現することが確認されたため、次のような方法で前記トランスジェニックタバコの抗真菌性を調査した: 1L当たりに乾燥した正常タバコ葉1gが入っているV8寒天培地にフィトフトラ・パラシチカ(*Phytophthora parasitica* pv. *Nicotianae* mycelia)を接種し、25°Cで光に露出させながら培養した。真菌の菌糸体の菌叢が形成した後(2-4日)、前記菌糸体を含む寒天ディスク(~8mm<sup>2</sup>)を切り出し、トランスジェニック又は非トランスジェニックタバコ植物体を4週間培養したMS寒天培地に移した。これらを25°Cで昼長さを16時間にして培養器で培養した。真菌感染は、接種7日後に裸眼又は顕微鏡観察で菌糸体の増殖を分析し

\*た。野生型植物体では疾患症状が現われ、完全に死んでしまったが、トランスジェニック植物体の場合は、フィトフトラパラシチカ感染による疾患症状を全然表さなかった。対照群タバコと転移体タバコの葉を採取してアニリンブルーで染色し、蛍光顕微鏡で観察した結果、真菌感染野生型植物体の葉には真菌の菌糸が広範囲に広がっていたが、接種を受けたトランスジェニック植物体の葉では菌糸の成長が観察されず、胞子嚢内の自己蛍光物質の存在による明るい蛍光を示した。

【0033】

【発明の効果】以上で詳細に説明したように、本発明はアサガオ(*Pharbitis nil* L.)成熟種子由来の抗菌性ペプチドのcDNA、前記cDNAを含む組み換え植物体の発現ベクター、及びそれを用いた抗真菌耐性を有するトランスジェニック植物体の製造方法を提供する。本発明の抗菌性ペプチドPn-AMPは多様な植物病原体に対して優れた抗菌活性を有しているため、前記ペプチドを発現するトランスジェニック植物体は多様な病原菌の感染に対して強い耐性を有することができる。

10 【0034】

#### SEQUENCE LISTING

<110> Korea Kumho Petrochemical Co., Ltd.

<120> Transgenic Plants Expressing Antimicrobial Peptides derived from Seed of *Pharbitis nil* L.

<130> PA99-224

<150> KR99-6622

<151> 1999-02-27

<160> 9

<170> KOPATIN 1.0

<210> 1

<211> 41

<212> PRT

<213> *Pharbitis nil* L.

<400> 1

Gln	Gln	Cys	Gly	Ser	Gln	Ala	Arg	Gly	Arg	Leu	Cys	Gly	Asn	Gly	Leu
1					5			10					15		
Cys	Cys	Ser	Gln	Trp	Gly	Tyr	Cys	Gly	Ser	Thr	Ala	Ala	Tyr	Cys	Gly
				20				25					30		
Ala	Gly	Cys	Gln	Ser	Gln	Cys	Lys	Ser							
				35				40							

<210> 2



15

16

&lt;211&gt; 40

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Pharbitis nil L.

&lt;400&gt; 2

Gln Gln Cys Gly Arg Gln Ala Ser Gly Arg Leu Cys Gly Asn Gly Leu

1

5

10

15

Cys Cys Ser Gln Trp Gly Tyr Cys Gly Ser Thr Ala Ala Tyr Cys Gly

20

25

30

Ala Gly Cys Gln Ser Gln Cys Lys

35

40

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 26

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; synthetic primer based on amino acid sequence in chitin-binding domain of Ph-AMP1 and Ph-AMP2

&lt;400&gt; 3

tggtgysnc artgggnta ytgycg

26

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 609

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Pharbitis nil L.

&lt;400&gt; 4

aaagaaagat caagaaacac ctactatact atacataaaa gagaaaatga aattctgtac 60

tatgtttctt gttgtcttgg ctttagccag cttgttgttg acaccatcaa caataatggc 120

acaacagtgt gggagtcaag cccgtgggcg tctgtgcggc aacggccttt gctgcagcca 180

gtggggctac tgtggctcca ctgcagccta ctgtggagct ggctgccaga gccaatgcaa 240

atctactgct gcttctgcca ccgacaccac caccactgca aaccaatcaa ccgctaagtc 300

ggatcccgcc ggcggtgcca actgatctca tcgatgatat gtacgttaga ccaccatgcg 360

ccgcacgccg atgtgccgta acctggccaa caaaaataa aagatgtgtc gttgtttagt 420

ttaattctag ataggtaggg taqgttatga aactaaagtg ggaaggacat acatgtgac 480

atctcacaaa tcaaatcttt ggaatgctct gcctactact ctatgtagtt tgaatgtcc 540

gactactttg ttttaatttt gaataagatc gatgaagcgt gcacggttgc aaaaagctaa 600

17

18

gttcactt 609

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 279

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Pharbitis nil L.

&lt;400&gt; 5

atgaaattct gtactatgtt tcttgtgtc ttggcttttag ccagcttgtt gttgacacca 60

tcaacaataa tggcacaaca gtgtgggagt caagcccgtg ggcgtctgtg cggcaacggc 120

ctttgtctga gccagtggg ctactgtgc tccactgca cctactgtg agctggctgc 180

cagagccaat gcaaatctac tctgtcttct gccaccgaca ccaccaccac tgcaaaccaa 240

tcaaccgcta agtcggatcc cggcggcggg gccactga 279

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 605

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Pharbitis nil L.

&lt;400&gt; 6

atatacaca aagaattgaa aatgaaatac gtactatgt ttattgttct cttgggttta 60

ggcagcttgt tttgacacc aacaacaata atggcacaac agtcgggag acaagccagt 120

ggcgtctgt gggcaacgg ctttctctgc agccagtgg gctactgtg ctccactga 180

gcctactgtg gagctgggtg ccagagccaa tgcaaatcta ctgtgtcttc ttccaccacc 240

actaccactg caaaccaatc aaccgctaag tcggatccc cggcgggtgc caactgatc 300

atctcatcga taatgtatga ccacctcac catgcacgca cgcacggcga tatgccgtaa 360

cctgcaggct agcaaaaact aaaagatgtg tcgtcgttta ttttaattct agataggtag 420

gtaggttatg aaactaaagt gggatgaaca tccgtgtgat catctcaca atcttaqcta 480

ggatatgatg ctctgccta ctactctatg tagttttaa tgtccgacta ctttatTTTA 540

atTTTgaata agatcaatgt ggcctgcatg gttgcaaca ctaaaaaaa aaaaaaaa 600

aaaaa 605

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 276

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Pharbitis nil L.

&lt;400&gt; 7

atgaaatact gtactatgtt tattgttctc ttgggttag gcagcttgtt gttgacacca 60

acaacaataa tggcacaaca gtgcgggaga caagccagtg ggcgtctgtg cggcaacggc 120

ctttgctgca gccagtgggg ctactgtggc tccactgcag cctactgtgg agctggttgc 180

cagaqccaat gcaaatctac tgctgcttct tccaccacca ctaccactgc aaaccaatca 240

accgctaagt cggatcccgc cggcgggtgcc aactga 276

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 92

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Pharbitis nil L.

&lt;400&gt; 8

Met Lys Phe Cys Thr Met Phe Leu Val Val Leu Ala Leu Ala Ser Leu

1 5 10 15

Leu Leu Thr Pro Ser Thr Ile Met Ala Gln Gln Cys Gly Ser Gln Ala

20 25 30

Arg Gly Arg Leu Cys Gly Asn Gly Leu Cys Cys Ser Gln Trp Gly Tyr

35 40 45

Cys Gly Ser Thr Ala Ala Tyr Cys Gly Ala Gly Cys Gln Ser Gln Cys

50 55 60

Lys Ser Thr Ala Ala Ser Ala Thr Asp Thr Thr Thr Thr Ala Asn Gln

65 70 75 80

Ser Thr Ala Lys Ser Asp Pro Ala Gly Gly Ala Asn

85 90

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 91

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Pharbitis nil L.

&lt;400&gt; 9

Met Lys Tyr Cys Thr Met Phe Ile Val Leu Leu Gly Leu Gly Ser Leu

1 5 10 15

Leu Leu Thr Pro Thr Thr Ile Met Ala Gln Gln Cys Gly Arg Gln Ala

20 25 30

Ser Gly Arg Leu Cys Gly Asn Gly Leu Cys Cys Ser Gln Trp Gly Tyr

35 40 45

Cys Gly Ser Thr Ala Ala Tyr Cys Gly Ala Gly Cys Gln Ser Gln Cys

50 55 60

Lys Ser Thr Ala Ala Ser Ser Thr Thr Thr Thr Thr Thr Ala Asn Gln Ser

65 70 75 80

Thr Ala Lys Ser Asp Pro Ala Gly Gly Ala Asn

85 90

【0035】

【配列表フリーテキスト】

【 0 0 3 6 】

【配列番号3】 Pn-AMP1及びPn-AMP2のキチン結合ドメインのアミノ酸配列に基づいて合成したプライマー

【0037】

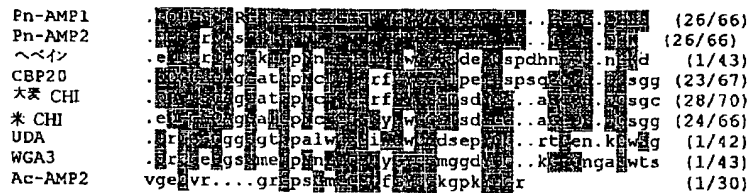
【図面の簡単な説明】

\*

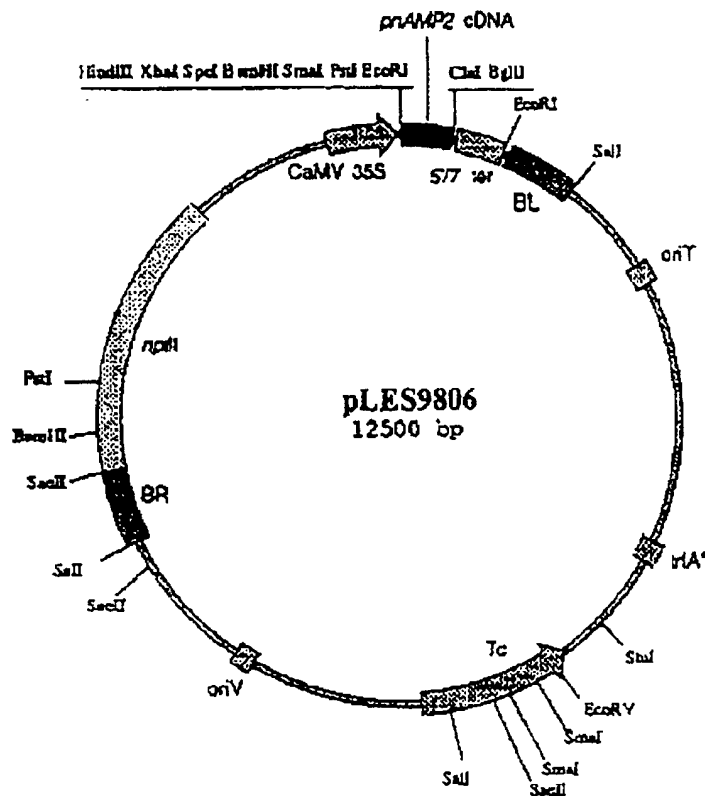
\*【図1】成熟Pn-AMP1のアミノ酸配列(配列番号1)及び成熟Pn-AMP2のアミノ酸配列(配列番号2)を他のキチン結合タンパク質のアミノ酸配列と相互比較した図面である。

【図2】 Pn-AMP2 cDNAを含む組み換え植物体発現ベクターpLES9806の遺伝子地図である。

【図 1】



【圖2】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>

C 1 2 N 1/21

//C 1 2 N 1/21

識別記号

FI

C 1 2 N 1/21 .

テーマコード（参考）

C12R 1:01)

(72)発明者 宋 泌淳

大韓民国 光州広域市 月溪洞756-2  
新東亜アパート102-906

(72)発明者 鄭 昌昊

大韓民国 光州広域市 西区 花停洞  
572番地 現代アパート100-1003